云 南 植 物 研 究 2002，**24**（6）：95～102
Acta Botanica Yunnanica

贯叶连翘总提取物对金黄色葡萄球菌的抗菌作用

李 宏[1,2]**，姜怀春**[3]**，邹国林**[1*]

（1 武汉大学生命科学学院，武汉 430072；2 重庆教育学院生命科学与化学系，重庆 400067；
3 重庆商学院科研处，重庆 600067）

摘要：以3株金黄色葡萄球菌为代表，分别探讨了经光照和未经光照处理后在培养24 h的过程中贯叶连翘总提取物（TEHPL）对3株金黄色葡萄球菌的光密度（OD_{640nm}）、活菌数（CFU）、总菌数（TCC）、最低杀菌浓度（MBC）的影响和对其中2株菌超氧化物歧化酶（SOD）的影响。结果表明TEHPL对金黄色葡萄球菌有抑菌和杀菌作用，其抑菌或杀菌作用与其浓度有关，不需光照。并且TEHPL诱导菌体细胞内SOD活力增高。

关键词：贯叶连翘；总提取物；金黄色葡萄球菌；抗菌作用；超氧化物歧化酶（SOD）
中图分类号：Q 946 **文献标识码：**A **文章编号：**0253－2700(2003)01－0095－08

Antibacterial Effect of the Total Extract of *Hypericum perforatum* on *Staphylococcus aureus*

LI Hong[1,2]，JIANG Huai-Chun[3]，ZOU Guo-Lin[1,*]

（1 *College of Life Sciences*，*Wuhan University*，Wuhan 430072，China；
2 *Department of Life Science and Chemistry*，*Chongqing College of Education*，Chongqing 400067，China；
3 *Section of Scientific Research*，*Chongqing Istitute of Commerce*，Chongqing 400067，China）

Abstract：This paper studied the effect of the total extract of *Hypericum perforatum* L. on three strains of *Staphylococcus aureus* in the course of 24 hour's incubation with and without illumination，during which the Optical Density value（640 nm），Colony Forming Unit，Total Cell Count，Minimum Bactericidal Concentration and superoxide dismutase（SOD）were tested. The results showed that the total extract had antibacterial effect on the three strains of *S. aureus*，its effect depended on its concentrations but was independent of illumination and it induced the increase of SOD activity in bacterial cells.

Key words：*Hypericum perforatum*；Total extract；*Staphylococcus aureus*；Antibacterial effect；Superoxide dismutase（SOD）

贯叶连翘（*Hypericum perforatum* L.，HPL）总提取物有抗抑郁作用（Hubner等，1994）；其中成分金丝桃素（hypericin）光照后能抗肿瘤及病毒（Ebermann等，1996；Prince等，2000），欧美等国对此研究较多。但对HPL抗菌作用的研究却极少。金丝桃素光照后

---

* 通讯联系人 Author for correspondence

收稿日期：2002－04－04，2002－06－21 接受发表

作者简介：李宏（1963－）女，讲师，硕士研究生，主要从事贯叶连翘研究。

虽能抗肿瘤和病毒，但不能抗菌（Kubin 等，1999）。迄今为止，尚无其总提取物（TEHPL）抗菌作用的报道。因 TEHPL 已用于临床治疗抑郁症（Hippius，1998），如果还能抗菌，将会扩大其在临床上的应用范围。所以本文以 3 株金黄色葡萄球菌为代表，研究了其抗菌作用，结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus* AB91118、AB93147 和 AB91053）来源于中国典型培养物保藏中心。培养基配方：水 1 000 ml，蛋白胨 10 g，牛肉膏 10 g，NaCl 5 g，葡萄糖 1 g，pH 7.2。1 000 ml 固体培养基，加 18 g 琼脂。其它试剂均为分析纯。53WB 分光光度计（上海光学仪器厂）。

1.2 TEHPL 的制备

于 6 ~ 7 月花期采植株顶端 25 cm 部分，干燥，粉碎，过 20 目筛。称 50 g 用醇法提取：于索氏提取器中用 95%乙醇作溶剂回流至乙醇无色（Meruelo 等，1988），收集提取物。室温减压回收提取物中乙醇和水至每隔 1 h 称量时重量减少小于 0.1 mg 为止，得褐色浸膏 TEHPL 3.8119 g，得率 7.62% 。称 TEHPL 溶于 40%乙醇配成浓度分别为 0.1、1.0 和 10.0 mg/ml 的 TEHPL 供试液。

1.3 TEHPL 抑菌及杀菌作用的测定

1.3.1 **处理设计** 将 3 株金黄色葡萄球菌培养至对数期（培养 6 h），用培养基调 OD_{640nm}（Optical Density）为 0.2，分别用 3 种浓度 TEHPL 供试液处理，处理设计见表 1。

表 1 3 种浓度 TEHPL 供试液分别对 3 株金黄色葡萄球菌的处理设计

Table 1 Separate treatment design of the effects of TEHPL at three concentrations on three strains of *Staphylococcus aureus*

处理代号	TEHPL		黄色葡萄球菌/ml	40%乙醇/ml	液体培养基/ml
Samples	浓度/mg.ml^{-1} Concentrations	加入量/ml Volume	*Staphylococcus aureus*	40% Ethanol	Liquid medium
$SH_{0.1}$	0.1	8	132		
$SH_{1.0}$	1.0	8	132		
$SH_{10.0}$	10.0	8	132		
$SCK_{溶}$			132	8	
$SCK_{空}$			132		8

将各处理样品于 4℃静置 1 h 以便 TEHPL 进入细菌细胞。为探讨光照对 TEHPL 抗菌作用的影响程度，将处理后的各样品等分为 2，分别进行光照（37℃水浴下，180W 光照 1 h）和不光照处理（37℃黑暗恒温箱中静置 1 h）。

各处理均重复 5 次，处理后在 37℃避光摇床上（150 r/min）培养 24 h，其间每隔 2 h 检测 1 次 OD_{640nm}，每隔 4 h 检测 1 次活菌数 CFU（Colony Forming Unit），在培养 4 h 和 24 h 时检测总菌数 TCC（Total Cell Count）。

1.3.2 **TEHPL 抑菌及杀菌作用参数的检测方法** OD_{640nm} 检测：每隔 2 h 取样在 640 nm 波长处检测 OD 值（OD_{640nm}），各样品分别用含相同浓度 TEHPL 供试液、或含 40%乙醇的液体培养基或纯液体培养基作空白对照，最后求出 5 个重复样品的平均 OD_{640nm} 值。

CFU 检测：10 倍稀释法。每个样品取稀释度为 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} 菌悬液 0.1 ml 于培养皿中，倒入 45℃的固体培养基，混匀，静置，凝固后倒置，37℃培养 48 h，每个稀释度做 3 个重复。计数 CFU，取 CFU 在 30 ~ 300 的平板求出各样品 CFU/ml 平均值。

TCC 检测：每个样品取稀释度为 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 菌悬液 2 ml 于不同试管中，沸水浴加热 10

min 杀死细菌。分别取不同稀释度已加热的菌悬液 0.3 ml 于不同试管中，然后在各试管中分别加入已离心（5 000 r/min，20 min）去除染料颗粒的美蓝上清液（祖若夫等，1993）2.7 ml，混匀。染色 10 min 后，取此混合菌液于血球计数板中，将此血球计数板于垫湿滤纸的加盖白瓷盘中静置 20 min 后计数 TCC。每个稀释度重复计数 3 次，求出各样品平均 TCC/ml 值。

MBC（Minimum Bactericidal Concentration）检测：将试管二倍稀释法（刘健等，2000）稍加改进：把一系列浓度（表 5）的 TEHPL 供试液 50 μl 分别加入盛 0.95 ml 3 株金黄色葡萄球菌培养物（$OD_{640nm}=0.2$）的试管中，同时分别做 3 株菌的溶剂对照（$CK_{溶}$）和空白对照（$CK_{空}$）。按处理设计（见 1.3.1）进行光照和不光照处理，每种处理重复 5 次。将所有试管置避光摇床（150 r/min）上 37℃培养 24 h 后，取 50 μL 培养液涂布于不含 TEHPL 的固体培养基平板上培养 48 h，无菌生长的平板所对应的最低 TEHPL 浓度即为最低杀菌浓度（MBC，mg/ml）。

SOD 活力检测：将处理设计（1.3.1 表 1）中 TEHPL 供试液浓度调整到 0.01、0.1、1.0 mg/ml，其余处理不变。37℃（150 r/min）培养 24 h，每隔 6 h 取样 4 ml，离心（6 000 r/min）4 min，用 2 ml pH8.2 的 Tris-HCl 缓冲液洗菌体：离心（6 000 r/min）4 min，弃上清液，同法再洗 1 次。迅速吸干管壁残留溶液并称菌体湿重（离心管已事先称重）。用 4 ml 同种缓冲液洗下管底菌体，摇匀，冰浴下用超声波（150 W）间歇式破菌体细胞 50 min，离心（7 000 r/min）3 min，弃沉淀，按阎家麒等（1993）的方法检测上清液中 SOD 活力并换算成每 g 湿菌体中 SOD 活力（u/g 湿菌体），重复 5 次，求平均值。同法检测初始（0 h）培养液（$OD_{640nm}=0.2$）的 SOD 活力。

2　结果与分析

2.1　TEHPL 处理 3 株金黄色葡萄球菌后的 OD_{640nm} 值

TEHPL 处理 3 株金黄色葡萄球菌后，分别进行光照和不光照处理，且每隔 2 h 检测 1 次 OD_{640nm} 值，结果见图 1 ~ 图 6。

从图 1 ~ 图 6 可知，3 株供试菌均以只加入液体培养基的空白对照（$SCK_{空}$）生长最好，加入 40% 乙醇的溶剂对照（$SCK_{溶}$）对生长有一定程度影响。用 TEHPL 的 3 个浓度（$SH_{0.1}$、$SH_{1.0}$、$SH_{10.0}$）处理 3 株供试菌，不同时段检测 OD_{640nm} 值，均小于 $SCK_{空}$ 和 $SCK_{溶}$，说明 TEHPL 对 3 株供试菌均有抑杀作用，以高浓度的抑杀作用更强；从光照与否对 TEHPL 的抗菌作用影响看，不光照的抑菌作用更强。

2.2　TEHPL 处理 3 株金黄色葡萄球菌后的 CFU 检测

TEHPL 处理后在 24 h 培养中，每隔 4 h 取样 1 次，经 10 倍稀释法稀释后于固体培养基上培养 48 h，计数 3 株供试菌的 CFU/ml，结果见表 2、表 3 和表 4。

从表 2、表 3 和表 4 可见，40% 乙醇对 3 株供试菌的生长均有一定程度抑制作用（$n_1/n_0>1$），TEHPL 有抑菌作用（$n_2/n_0<1$、$n_3/n_0<1$、$n_4/n_0<1$），且其浓度越高，抑菌作用越强（$n_3/n_2<1$、$n_4/n_3<1$）。这些结果与图 1 – 图 6 的结果一致。且 3 株供试菌的 $SH_{10.0}$ 的 CFU/ml 以及 $SH_{10.0}$ 与 $SCK_{溶}$ 的比值（n_4/n_0）分别在培养至 20 h（AB91118）、16h（AB93147）和 24 h（AB91053）时降至零，说明高浓度 TEHPL 对金黄色葡萄球菌有杀菌作用；并且光照降低了 TEHPL 的抑杀作用。

2.3　培养 4 h、24 h 时 3 株金黄色葡萄球菌的 TCC

结果见图 7 ~ 图 9。由图可见，无论是否光照，培养 24 h，3 株供试菌的 $SH_{0.1}$ 的 TCC

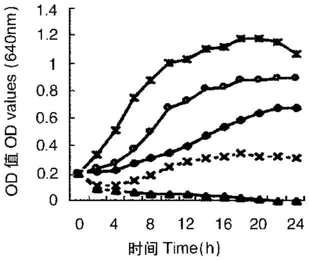

图1 TEHPL处理AB91118后的OD值（光照）

Fig. 1 OD values of AB91118 treated with TEHPL under illumination

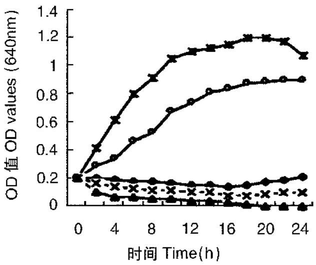

图2 TEHPL处理AB91118后的OD值（不光照）

Fig. 2 OD values of AB91118 treated with TEHPL without illumination

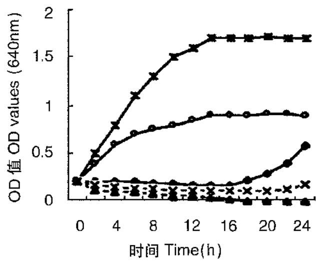

图3 TEHPL处理AB93147后的OD值（光照）

Fig. 3 OD values of AB93147 treated with TEHPL under illumination

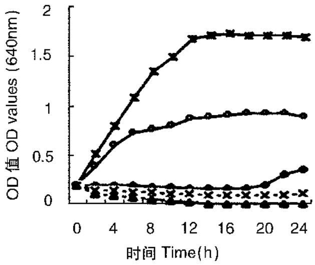

图4 TEHPL处理AB93147后的OD值（不光照）

Fig. 4 OD values of AB93147 treated with TEHPL without illumination

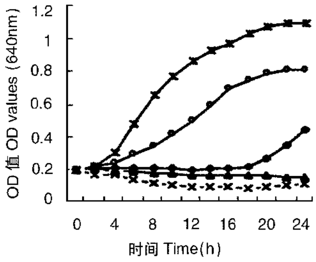

图5 TEHPL处理AB91053后的OD值（光照）

Fig. 5 OD values of AB91053 treated with TEHPL under illumination

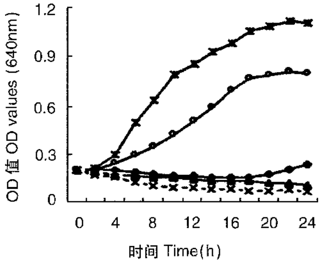

图6 TEHPL处理AB91053后的OD值（不光照）

Fig. 6 OD values of AB91053 treated with TEHPL without illumination

注：—✱— SCK空；—○— SCK溶；—◆— $SH_{0.1}$；—✕— $SH_{1.0}$；—▲— $SH_{10.0}$

表2 TEHPL处理AB91118后的CFU/ml

Table 2 CFU/ml of AB91118 samples treated with TEHPL

取样时间 Time	光照与否 Illumination or dark	SCK溶 (n_0)	SCK空 (n_1)	n_1/n_0	$SH_{0.1}$ (n_2)	n_2/n_0	$SH_{1.0}$ (n_3)	n_3/n_0	$SH_{10.0}$ (n_4)	n_4/n_0	n_3/n_2	n_4/n_3
4h	光照 Illumination	1.00×10^8	1.52×10^8	1.5200	3.60×10^7	0.3600	7.31×10^6	0.0731	4.50×10^5	0.0045	0.2031	0.0616
	不光照 Dark	0.94×10^8	1.71×10^8	1.8191	3.40×10^7	0.3617	9.05×10^5	0.0096	3.90×10^4	0.0004	0.0266	0.0431
8h	光照 Illumination	1.36×10^8	1.66×10^8	1.2206	5.10×10^7	0.3750	1.31×10^6	0.0096	8.07×10^4	0.0006	0.0257	0.0082
	不光照 Dark	1.43×10^8	1.84×10^8	1.2867	3.11×10^7	0.2175	7.00×10^5	0.0049	5.01×10^3	0	0.0225	0.0072
12h	光照 Illumination	1.84×10^8	2.10×10^8	1.1413	6.32×10^7	0.3435	1.59×10^7	0.0864	6.22×10^4	0.0003	0.2516	0.0039
	不光照 Dark	1.91×10^8	3.43×10^8	1.7958	3.00×10^7	0.1571	1.95×10^5	0.0010	3.16×10^3	0	0.0065	0.0162
16h	光照 Illumination	2.52×10^8	4.39×10^8	1.7421	6.90×10^7	0.2738	1.75×10^7	0.0694	3.04×10^3	0	0.2536	0.0002
	不光照 Dark	2.58×10^8	4.70×10^8	1.8217	2.97×10^7	0.1151	1.55×10^5	0.0006	2.50×10^2	0	0.0052	0.0028
20h	光照 Illumination	2.73×10^8	3.51×10^8	1.2857	7.44×10^7	0.2725	3.57×10^7	0.1308	0	0	0.4798	0
	不光照 Dark	2.85×10^8	3.53×10^8	1.2386	5.66×10^6	0.0199	9.00×10^4	0.0003	0	0	0.0159	0
24h	光照 Illumination	1.54×10^8	2.60×10^8	1.6883	1.08×10^8	0.7013	8.55×10^7	0.5552	0	0	0.7917	0
	不光照 Dark	1.70×10^8	2.55×10^8	1.5000	4.20×10^5	0.0025	6.50×10^4	0.0004	0	0	0.1548	0

表 3　TEHPL 处理 AB93147 后的 CFU/ml

Table 3　CFU/ml of AB93147 samples treated with TEHPL

取样时间 Time	光照与否 Illumination or dark	SCK$_{溶}$（n_0）	SCK$_{空}$（n_1）	n_1/n_0	SH$_{0.1}$（n_2）	n_2/n_0	SH$_{1.0}$（n_3）	n_3/n_0	SH$_{10.0}$（n_4）	n_4/n_0	n_3/n_2	n_4/n_3
4h	光照 Illumination	5.88×10^{8}	6.86×10^{8}	1.1667	2.57×10^{6}	0.0044	2.40×10^{6}	0.0041	1.52×10^{6}	0.0026	0.9339	0.6333
	不光照 Dark	6.30×10^{8}	7.90×10^{8}	1.2540	2.31×10^{6}	0.0037	2.00×10^{6}	0.0032	3.43×10^{5}	0.0005	0.8658	0.1715
8h	光照 Illumination	6.12×10^{8}	8.15×10^{8}	1.3317	1.66×10^{6}	0.0027	8.51×10^{5}	0.0014	8.57×10^{4}	0.0001	0.5127	0.1007
	不光照 Dark	6.55×10^{8}	8.33×10^{8}	1.2718	1.59×10^{6}	0.0024	6.50×10^{5}	0.0010	1.57×10^{5}	0.0002	0.4088	0.2415
12h	光照 Illumination	6.53×10^{8}	1.22×10^{9}	1.8683	1.05×10^{6}	0.0016	6.65×10^{5}	0.0010	1.74×10^{4}	0	0.6333	0.0262
	不光照 Dark	6.86×10^{8}	1.26×10^{9}	1.8367	1.00×10^{6}	0.0015	5.22×10^{5}	0.0008	5.10×10^{2}	0	0.5220	0.0010
16h	光照 Illumination	8.44×10^{8}	1.38×10^{9}	1.6351	1.20×10^{6}	0.0014	3.30×10^{5}	0.0004	1.40×10^{2}	0	0.2750	0.0004
	不光照 Dark	8.51×10^{8}	1.45×10^{9}	1.7039	9.51×10^{5}	0.0011	1.73×10^{5}	0.0002	0	0	0.1819	0
20h	光照 Illumination	8.83×10^{8}	1.55×10^{9}	1.7554	3.00×10^{6}	0.0034	1.85×10^{5}	0.0002	0	0	0.0617	0
	不光照 Dark	8.80×10^{8}	1.31×10^{9}	1.4886	1.63×10^{6}	0.0019	1.15×10^{5}	0.0001	0	0	0.0706	0
24h	光照 Illumination	5.39×10^{8}	7.97×10^{8}	1.4787	5.10×10^{6}	0.0095	1.12×10^{5}	0.0002	0	0	0.0220	0
	不光照 Dark	7.17×10^{8}	7.84×10^{8}	1.0934	3.30×10^{6}	0.0046	7.30×10^{4}	0.0001	0	0	0.0221	0

表 4　TEHPL 处理 AB91053 后的 CFU/ml

Table 4　CFU/ml of AB91053 samples treated with TEHPL

取样时间 Time	光照与否 Illumination or dark	SCK$_{溶}$（n_0）	SCK$_{空}$（n_1）	n_1/n_0	SH$_{0.1}$（n_2）	n_2/n_0	SH$_{1.0}$（n_3）	n_3/n_0	SH$_{10.0}$（n_4）	n_4/n_0	n_3/n_2	n_4/n_3
4h	光照 Illumination	2.12×10^{7}	3.40×10^{7}	1.6038	6.09×10^{6}	0.2873	4.89×10^{6}	0.2307	1.68×10^{6}	0.0792	0.8030	0.3436
	不光照 Dark	2.30×10^{7}	3.51×10^{7}	1.5261	5.71×10^{6}	0.2483	4.80×10^{6}	0.2087	1.45×10^{6}	0.0630	0.8406	0.3021
8h	光照 Illumination	6.00×10^{7}	7.18×10^{7}	1.1967	5.85×10^{6}	0.0975	3.23×10^{6}	0.0538	1.35×10^{6}	0.0225	0.5521	0.4180
	不光照 Dark	6.15×10^{7}	7.40×10^{7}	1.2033	5.56×10^{6}	0.0904	3.00×10^{6}	0.0488	1.11×10^{6}	0.0180	0.5396	0.3700
12h	光照 Illumination	1.05×10^{8}	1.36×10^{8}	1.2952	5.61×10^{6}	0.0534	1.66×10^{6}	0.0158	2.03×10^{5}	0.0019	0.2959	0.1223
	不光照 Dark	1.16×10^{8}	1.55×10^{8}	1.3362	5.33×10^{6}	0.0459	1.20×10^{6}	0.0103	2.01×10^{5}	0.0017	0.2251	0.1675
16h	光照 Illumination	1.25×10^{8}	1.77×10^{8}	1.4160	9.70×10^{6}	0.0776	1.30×10^{6}	0.0104	9.86×10^{4}	0.0008	0.1340	0.0758
	不光照 Dark	1.21×10^{8}	2.03×10^{8}	1.1777	5.04×10^{6}	0.0417	1.12×10^{6}	0.0093	9.17×10^{4}	0.0008	0.2222	0.0819
20h	光照 Illumination	2.18×10^{8}	2.66×10^{8}	1.2202	1.55×10^{7}	0.0711	1.93×10^{6}	0.0089	2.65×10^{3}	0	0.1245	0.0014
	不光照 Dark	2.32×10^{8}	2.99×10^{8}	1.2888	7.92×10^{6}	0.0341	1.01×10^{6}	0.0044	1.25×10^{3}	0	0.1275	0.0012
24h	光照 Illumination	2.01×10^{8}	3.04×10^{8}	1.5124	2.36×10^{7}	0.1174	3.15×10^{6}	0.0157	0	0	0.1335	0
	不光照 Dark	1.93×10^{8}	3.22×10^{8}	1.6684	1.35×10^{7}	0.0699	9.80×10^{5}	0.0051	0	0	0.0726	0

均增加，但分别小于各自的 SCK$_{溶}$、SCK$_{空}$ 的相应 TCC，说明低浓度 TEHPL 均抑制 3 株供试菌；在 24 h 检测，供试菌株 AB91118 和 AB93147 的 SH$_{10.0}$的 TCC 几乎降至零，证明这 2 珠菌的 SH$_{10.0}$中菌体不仅死亡（表 2，3），且已裂解，这与这 2 珠菌的 OD$_{640nm}$在 24 h 时也降至零的结果一致（图 1，4）；在 24 h 时检测，AB91053 的 SH$_{10.0}$的 TCC 高于其 SH$_{1.0}$的相应 TCC，这与其 OD$_{640nm}$ 也高于其 SH$_{1.0}$的相应 OD$_{640nm}$ 的结果（图 5，6）一致，但 24 h 时，AB91053 的 SH$_{10.0}$的 CFU/ml 降至零（表 4），说明其 SH$_{10.0}$中菌体已死亡但未裂解。

2.4　MBC 检测结果

从表 5 可知，光照处理后 TEHPL 抗 3 株供试菌的 MBC 分别是，AB91118：0.475 mg/ml（光照）、0.200 mg/ml（不光照）；AB93147：0.375 mg/ml（光照）、0.150 mg/ml（不光照）；

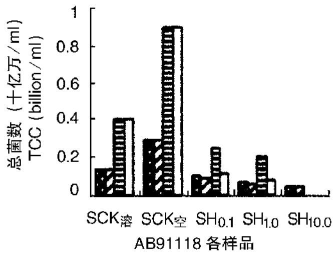

图 7　TEHPL **处理** AB91118 **后的** TCC

Fig. 7　TCC of all the samples of AB91118 treated with TEHPL

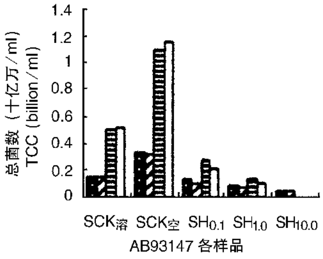

图 8　TEHPL **处理** AB93147 **后的** TCC

Fig. 8　TCC of all the samples of AB93147 treated with TEHPL

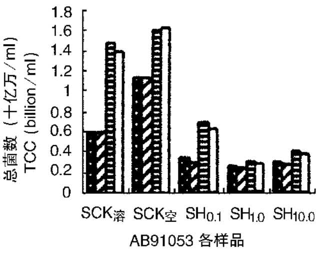

图 9　TEHPL **处理** AB91053 **后的** TCC

Fig. 9　TCC of all the samples of AB91053 treated with TEHPL

注：■：光照处理，培养 4 h。4h after incubation with illumination.　▨：不光照处理，培养 4 h。4h after incubation without illumination.
▤：光照处理，培养 24 h。24h after incubation with illumination.　□：不光照处理，培养 24 h。24h after incubation without illumination.

表 5　**MBC 检测结果**

Table 5　Result of MBC measurement

菌株 strains	**光照与否** Illumination or dark	TEHPL **原液浓度**/mg.ml^{-1} Concentrations of TEHPL stock solutions/mg.ml^{-1}																													**对照** Controls	
		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0	11.5	12.0	12.5	13.0	13.5	14.0	14.5	15.0	SCK溶	SCK空
AB91118	**（光照）** （Illumination）	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
	（不光照） （Dark）	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
AB93147	**（光照）** （Illumination）	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
	（不光照） （Dark）	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
AB91053	**（光照）** （Illumination）	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
	（不光照） （Dark）	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+

注： +　**表示经培养后试管中有存活的细菌；** −　**表示经培养后试管中无存活的细菌。**

Note：+　means there were survival bacterial cells in the test tubes after incubation. −　means there were not any survival bacterial cells in the test tubes after incubation.

AB91053：0.425 mg/ml **（光照）**、0.250 mg/ml **（不光照），所以光照处理降低了其杀菌作用。**

5 次重复的结果表明，3 株菌中各株菌的 $SH_{0.1}$、$SH_{1.0}$、$SH_{10.0}$ **和** $SCK_{溶}$ **之间以及** $SH_{0.1}$、$SH_{1.0}$、$SH_{10.0}$ **之间各自的** OD_{640nm}、CFU、TCC **和** MBC **均存在显著差异（**$p < 0.05$**）。同浓度光照与非光照之间也存在显著差异（**$p < 0.05$**）。**

2.5　SOD 检测结果

用 0.01、0.1、1.0 mg/ml TEHPL **参照处理设计处理** AB91118 **和** AB91053，37℃（150 r/min）**培养** 24 h，**每隔** 6 h **检测** 1 **次** SOD，**结果见图** 10～**图** 13。

图 10～**图** 13 **中，**2 **株菌不同时段** SOD **活力从大到小均依次是：**$SH_{1.0} > SH_{0.1} > SH_{0.01} > SCK_{溶} > SCK_{空}$**，这一结果表明** TEHPL **的浓度越高，每克湿菌体中的** SOD **活力越高。**TEHPL **浓度相同时，未光照处理的样品每克湿菌体中的** SOD **活力高于经光照的样品。重复** 5 **次的**

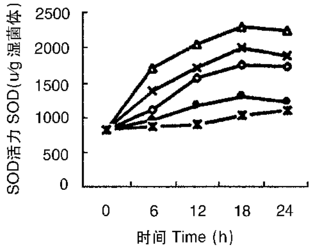

图 10　TEHPL 处理 AB91118 后的 SOD 活力（光照）

Fig.10　The changes in SOD of AB91118 treated with TEHPL under illumination

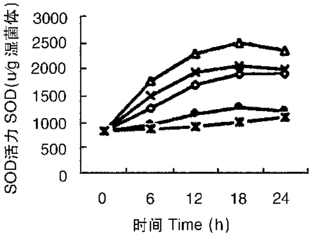

图 11　TEHPL 处理 AB91118 后的 SOD 活力（不光照）

Fig.11　The changes in SOD of AB91118 treated with TEHPL without illumination

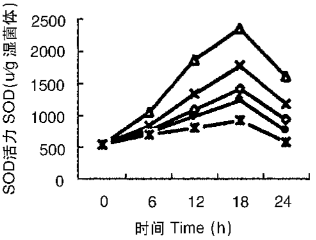

图 12　TEHPL 处理 AB91053 后的 SOD 活力（光照）

Fig.12　The changes in SOD of AB91053 treated with TEHPL under illumination

注：—✖—$SCK_{空}$：—●—$SCK_{溶}$：—◇—$SH_{0.01}$：—×—$SH_{0.1}$：—△—$SH_{1.0}$

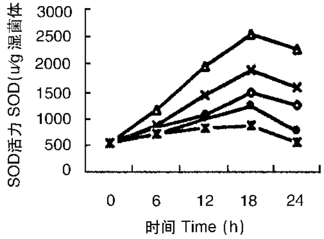

图 13　TEHPL 处理 AB91053 后的 SOD 活力（不光照）

Fig.13　The changes in SOD of AB91053 treated with TEHPL without illumination

结果表明 2 株菌中每株菌的 SOD 活力在 $SH_{0.01}$、$SH_{0.1}$、$SH_{1.0}$与 $SCK_{溶}$ 之间以及 $SH_{0.01}$、$SH_{0.1}$、$SH_{1.0}$之间存在显著差异（$p < 0.05$），同浓度光照和不光照样品也存在显著差异（$p < 0.05$）。

3　讨论

因样品总体积均为 140 ml，则含 3 种不同浓度 TEHPL 供试液的样品中 TEHPL 的终浓度分别为 0.0057 、0.0571、0.5714 mg/ml，前 2 种浓度在 OD_{640nm}检测、CFU 检测和 TCC 检测中对 3 株供试菌有抑菌作用，后 1 种浓度有杀菌作用，这与 TEHPL 对 3 株供试菌的 MBC 介于 0.0571 mg/ml 和 0.5714 mg/ml 之间（表 5）的结果一致。各项检测均表明 TEHPL 对 3 株供试金黄色葡萄球菌的抑杀作用依赖于其浓度且不需光照。

SOD 是生物体内的保护性酶，具有清除氧自由基的作用，其活力可诱导增高（Bebien 等，2002）。本研究结果证明，TEHPL 可诱导菌体中 SOD 活力增加，但 OD_{640nm}检测、CFU 检测、TCC 检测和 MBC 检测均表明 TEHPL 的浓度越高，对金黄色葡萄球菌的抑杀作用越强，说明 TEHPL 对金黄色葡萄球菌的抑杀作用并不是破坏了保护性酶 SOD，而是存在其他机制。

由于 HPL 中金丝桃素的抗肿瘤和抗病毒（包括 HIV）作用依赖于光照条件（Ebermann，1996；Miccoli，1998；Weller，1997），而金丝桃素在强光照射下易引起光敏性皮炎（Schempp，2000），这一副作用限制了其抗肿瘤、抗病毒作用在临床上的应用。虽然研究人员进行了大量研究欲消除这一副作用，但迄今为止尚未取得突破性进展。所以光敏化副作用使其抗多种肿瘤和病毒的作用一直停留在研究阶段。但因 TEHPL 的抗抑郁作用不需光照处理，所以避免了其中金丝桃素引起的这一副作用，在临床上得到了广泛应用（Ernst，1998）。例如，德国经每日处方在 1996 年一年时间就开出 131.5 百万剂 TEHPL 用于

治疗轻度到中度抑郁症（Orth，1999），表明 TEHPL 在临床上应用的安全性已得到认可。而本实验中发现 TEHPL 具有抗菌作用且不必光照，因此，用于临床作抗菌药对人体既是安全的，又可避免光敏化副作用的出现，还可控制病人因细菌感染可能引起的抑郁症状，具有较好的临床应用价值。

我国的 HPL 资源丰富，它广布于四川、云南、贵州、陕西、安徽等省。如果能将其开发成抗菌和抗抑郁药物，不仅可有效利用植物资源，对人类健康事业做出一份贡献，并且还能带来较大的经济效益。

〔参 考 文 献〕

祖若夫，胡宝龙，周德庆，1993．**微生物学实验教程**［M］．**上海：复旦大学出版社**，119—125

Bebien M，Lagniel G，Garin J，*et al*，2002．Involvement of superoxide dismuataes in the response of *Escherichia coli* to selenium oxides［J］．*J Bacteriol*，**184**（6）：1556—1564

Ebermann R，Alth G，Kreitner M，*et al*，1996．Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells［J］．*J Photochem Photobiol B*，**36**（2）：95—97

Ernst E，Rand JI，Barnes J，*et al*，1998．Adverse effects profile of the herbal antidepressant St．John 's wort（*Hypericum perforatum* L.）［J］．*Eur J Clin Pharmacol*，**54**（8）：589—594

Hippius H，1998．St John 's Wort（*Hypericum perforatum*）-a herbal antidepressant［J］．*Curr Med Res Opin*，**14**（3）：171—184

Hubner WD，Lande S，Podzuweit H，1994．Hypericum treatment of mild depressions with somatic symptoms［J］．*J Geriatr psychiatry Neurol*，**7** Suppl **1**：S12—14

Kubin A，Wierrani F，Jindra RH，*et al*，1999．Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin，meso-tetrahydroxyphenylchlorin（mTHPC）and Photofrin Ⅱ on *Staphylococcus aureus*［J］．*Drugs Exptl Clin Res*，**25**（1）：13—21

Liu J（**刘健**），Chen Y（**陈扬**），Hou F（**侯芳**），*et al*，2000．Comparative *in vitro* activity of ceftibuten［J］．*Chin J Clin Pharmacol*（**中国临床药理学杂志**），**16**（4）：243—250

Meruelo D，Lavie G，Lavie D，1988．Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses：aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin［J］．*Proc Natl Acad Sci USA*，**85**（14）：5230—5234

Miccoli L，Beurdeley-Thomas A，De Pinieux G，*et al*，1998．Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inbibiting hexokinase bound to mitochondria［J］．*Cancer Res*，**58**（24）：5777—5786

Orth HC，Rentel C，Schmidt PC．1999．Isolation，purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L［J］．*J pharm Pharmacol*，**51**（2）：193—200

Prince AM，Pascual D，Meruelo D，*et al*，2000．Strategies for evaluation of enveloped virus inactivation in red cell concentrates using Hypericin［J］．*Photochem Photobiol*，**71**（2）：188—195

Schempp CM，Ludtke R，Winghofer B，*et al*，2000．Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract（St．John 's wort）on skin sensitivity to solar simulated radiation［J］．*Photodermatol Photoimmunol Photomed*，**16**（3）：125—128

Weller M，Trepel M，Grimmel C，*et al*，1997．Hypericin-induced apoptosis of human malignant glioma cell is light-dependent，independent of bc1－2 expression，and does not require wild-type p53［J］．*Neurol Res*，**19**（5）：459—470

Yan JQ（**阎家麒**），Zhu Y（**朱琰**），Chang KL（**常开林**），*et al*，1993．Improved assay of modified superoxide dismutase activity［J］．*Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*（**中国生化药物杂志**），**65**（3）：49—51